


**PREVENTIVE OR THERAPEUTIC AGENT FOR INFECTIOUS DISEASES
CONTAINING MIZORIBINE AS ACTIVE INGREDIENT**

Publication number: JP5310578 (A)

Also published as:

Publication date: 1993-11-22

 WO9323056 (A1)

Inventor(s): KOSUGI YOSHINORI +

Applicant(s): ASahi CHEMICAL IND +

Classification:

- international: **A61K31/70; A61K31/7042; A61K31/7052; A61K31/7056;
A61P31/12; A61P31/16; C07H19/052; A61K31/70;
A61K31/7042; A61P31/00; C07H19/00; (IPC1-7): A61K31/70;
A61K31/70; C07H19/052**

- European: **A61K31/70; C07H19/052**

Application number: JP19920123386 19920515

Priority number(s): JP19920123386 19920515

Abstract of JP 5310578 (A)

PURPOSE:To provide the subject medicine containing mizoribine as the active component, low in cytotoxicity exhibiting an antiviral activity against a virus belonging to human infectious disease Orthomyxoviridae or Paramyxoviridae and useful for influenza, measles, etc. **CONSTITUTION:**The objective medicine contains mizoribine (chemical name; 4-carbamoyl-1-beta-D-ribofuranosyl-imidazolium-5-oleate) as the active component. In addition, the dosage form of this medicine is preferably an oral preparation or an aerosol inhalant. As the dosage of mizoribine, preferably 1 to 20mg/kg (body weight) per day is administered in one to several times in the case of an adult.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-310578

(43)公開日 平成5年(1993)11月22日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70	A F E	8314-4 C		
	A D Y			

// C 0 7 H 19/052

審査請求 未請求 請求項の数 2(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平4-12386	(71)出願人 旭化成工業株式会社
(22)出願日 平成4年(1992)5月15日	大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
	(72)発明者 小杉 善則 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1 旭化成工業株式会社内

(54)【発明の名称】 ミゾリピンを有効成分とする感染疾患の予防または治療剤

(57)【要約】

【構成】 ミゾリピン(化学名: 4-カルバモイル-1-β-D-リボフラノシル-イミダゾリウム-5-オレイト)を有効成分とするヒト感染性オルトミクソウィルス科またはパラミクソウィルス科に属するウィルスによる感染疾患の予防または治療剤。

【効果】 ミゾリピンは、オルトミクソウィルス科またはパラミクソウィルス科に属する特定のRNAウィルスに極めて少量で強い抗ウィルス活性を示し、その結果、これらのウィルスに起因する感染疾患に対する有用な予防または治療剤を提供することが可能となった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ミゾリピンを有効成分とするヒト感染性オルトミクソウイルス科またはパラミクソウイルス科に属するウイルスによる感染疾患の予防または治療剤。

【請求項2】 予防または治療剤が、経口投与用製剤またはエアゾール吸入用製剤である請求項1項記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ミゾリピン (Mizoribine; 化学名: 4-カルバモイル-1-β-D-リボフラノシルイミダゾリウム-5-オレート) を有効成分とするオルトミクソウイルス科またはパラミクソウイルス科に属するウイルスによる感染疾患の予防または治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】ミゾリピンは、オイベニシリウム属に属するオイベニシリウム・プレフェルディナムM-2166株 (FERM-P-1104) の培養液より発見された核酸関連物質で、水に易溶で、200℃付近で褐色発色分解する弱酸性物質であって、その製造方法としては、上記の菌株を用いる酸酵法や化学合成法等の種々の方法が知られている (J. Antibiotics, 27, (10), 775 (1974), Chem. Pharm. Bull., 23, 245 (1975)、特開昭48-56894号公報、特開昭50-121275号公報、特開昭50-121276号公報、特開昭51-1693号公報等)。

【0003】またミゾリピンは、免疫抑制作用を有し、例えば腎移植における拒否反応の抑制に有用性が認められ、通常体重1kg当たり、初期量としてミゾリピン2~3mg相当量、維持量として1~2mg相当量を1日量として経口投与するアレディニン (登録商標名: 旭化成工業株式会社) 錠として無水系結晶体が使用されている。またミゾリピンは、DNAウイルスであるワクシニアウイルスに対する強い抗ウイルス活性を示すことが知られている (特開昭48-56894号公報) が、RNAウイルスであるマウス感染性1型バインフルエンザ H1N1ウイルスやボリオウイルスには効果を示さないことが報告されている (J. Antibiotic, 27, (10), 775 (1974))。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】近年、ヘルペスウイルスやエイズウイルスなどに対する化学療法剤が開発されてウイルス病の原因療法が可能となった。オルトミクソウイルス科 (例えばA型、B型、C型インフルエンザウイルスなど) またはパラミクソウイルス科 (例えば麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、バインフルエンザウイルスやヒパニチウイルス・シンチアルウイルス (Respiratory syncytial virus: 50

以下RSウイルスと略称) などの種々のRNAウイルスは、ウイルス性呼吸器感染症を初めとする多種感染疾患の病原ウイルスとして最も注意すべきウイルスである。この2つのウイルス科に属するウイルスによる疾患の病原ウイルスを臨床的に鑑別することは、特徴的な発疹を呈した麻疹、典型的な耳下腺腫脹のあるムンプス及び流行性期のインフルエンザを除いて困難である。そこで、これらのウイルスに広いスペクトラムを有する抗ウイルス剤が切望されている (化学療法誌, Vol. 1, 7 No. 10 1991)。

【0005】現在までに、上記のオルトミクソウイルス科やパラミクソウイルス科に対して塩酸アマンタジン、塩酸リマンタジンやリバビリン (1-β-D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide) が有効であるとの報告がある (J. Med., 281: 578-584 (1969), 381: 1443-1447 (1983), J. pediatr., 117, 313-320 (1990))。しかし、前者の2つは、オルトミクソウイルス科のA型インフルエンザのみに有効で、B、C型インフルエンザやパラミクソウイルス科のウイルスには無効である。一方、リバビリンは、これらの2つの科のウイルスに広く抗ウイルス活性を有しており、米国にてRSウイルスに対する唯一の抗ウイルス剤として認可されているが、細胞毒性が強く、エアゾール吸入法による長時間投与と治療を要するなどの種々の制約がある。そこで、さらに抗ウイルス活性が強くより安全な製剤が切望されている。

【0006】

【課題を解決しようとするための手段】一方、前述の通りミゾリピンは、一部のDNAウイルスに有効であるが、RNAウイルスには無効であった (J. Antibiotics, 27, (10), 775 (1974)) が、全く意外にも、ミゾリピンが、ヒト感染性のパラミクソウイルス科またはオルトミクソウイルス科に属するウイルスに対して、従来から用いられてきたリバビリンよりも強い抗ウイルス活性を示し、かつ細胞毒性も低いことを見出した。その結果、リバビリンより優れた予防または治療剤を提供することが可能となった。

【0007】本発明は、上記の知見によって完成されたもので、ミゾリピンを有効成分とするヒト感染性オルトミクソウイルス科またはパラミクソウイルス科に属するウイルスによる感染疾患の予防または治療剤である。本発明におけるミゾリピンは、すでに市販されている免疫抑制剤であって、急性毒性 (LD₅₀) が雌雄のマウスに対し経口で>4883mg/kg、皮下で>4883mg/kg、静脈内で>3042mg/kg、筋肉内で>2800mg/kg、雄性ラットに対し経口で>3100mg/kg、皮下で>4161mg/kg、静脈内で>2572mg/kg、筋肉内で>2800mg/kg

g、雌性ラットに対し経口で $>2847\text{mg/kg}$ 、皮下で $>3795\text{mg/kg}$ 、静脈内で $>2608\text{mg/kg}$ 、筋肉内で $>2800\text{mg/kg}$ と安全であり、また各種組織培養細胞に対する毒性は以下の通りであり極めて細胞毒性の低い薬物である。

【0008】〔細胞毒性〕

(実験方法) ダルベッコ・ミニマム・エッセンシャル・メディアム(Dulbecco's Minimum Essential Medium; 以下、D-MEM培地と略称)に、牛胎児血清10%を加えた培地を用いてVero細胞、MDCK細胞(以上、大日本製薬社製)を培養した。G-HeLa細胞(Antimicrobi

(結果)

G-HeLa細胞(ヒト子宮頸管由来細胞)	$>500\mu\text{g/ml}$
Vero細胞(アフリカ緑猴腎臓由来細胞)	$>500\mu\text{g/ml}$
MDCK細胞(イヌ腎臓細胞由来細胞)	$>500\mu\text{g/ml}$

このミゾリピンは、経口投与製剤(登録商標名: プレディン錠)として使用するものが簡便であり、また適宜カプセル剤、顆粒剤等の経口投与製剤、生剤、エアゾール吸入法による製剤、経皮吸収性製剤や注射剤として常法の製剤化技術にて製剤化することができる。具体的には、経口投与製剤は、例えば、賦形剤として無水乳糖、結晶セルロース、デキストラン、スターチなど、結合剤としてカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロースなど、崩壊剤としてはカルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム、メチルセルロースなど、滑沢剤としてステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどを適宜選択組合せ、常法により錠剤、カプセル剤などの経口投与製剤とすることができる。

【0010】また、例えばエアゾール用液剤や注射剤としては、ミゾリピンを水性溶媒に溶解させることによって製造することができ、ミゾリピンの液剤中における濃度は水性溶媒に対して、0.1~10 W/V %、好ましくは1~10%程度になるよう調整し、特に注射剤については調整後滅菌または除菌処理して製剤とすればよい。この水性溶媒としては、例えば注射用蒸留水、滅菌精製水等が例示される。さらに通常液剤に適宜選択して用いられる添加剤、例えばpH調整用の緩衝剤(例えば、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酒石酸緩衝液、酢酸緩衝液等)、等張化剤(例えば、ソルビトール、グリセリン、ポリエチレングリコール、ポリビレングリコール、グルコース、塩化ナトリウム等)、安定化剤(例えば、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、メタ重亜硫酸塩等)、防腐殺菌剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸エステル類、ベンジルアルコール、パラクロルメタキシノール、クロロクレゾール、フェニチルアルコール、ソルビン酸またはその塩、チモサル、クロブタノール等)、キレート剤(例えば、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、縮合リン酸

al Agents and Chemotherapy Vol. 36, No. 2, 435-439, 1992)はこの培地にさらにグルコース16g/lを加えた培地を用いて培養した。

【0009】96穴プラスチックプレート(ファルコン3402)に各細胞を 2×10^4 cell/wellずつ分注し所定の濃度に希釈したミゾリピン含有の培地を添加した後、37℃、5%炭酸ガス培養装置内で3日間培養した。MTT法(代謝, Vol. 28, No. 2, 眼でみるページ333, 1991)により細胞に対する毒性を調べた。

ナトリウム等)、粘着剤(例えば、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム等)等を通常使用される添加量で配合添加することができる。

【0011】ヒト感染性のオルトミクソウイルス科に属するウィルスとしては、インフルエンザウィルスに属するウィルス、例えばインフルエンザウィルスに属するA型、B型、C型インフルエンザウィルスが挙げられる。また、ヒト感染性パラミクソウイルス科に属するウィルスとしては、パラミクソウィルス属、モルビウィルス属およびニューモウィルス属に属するウィルスが挙げられ、例えばパラミクソウィルス属に属する2、3型パラインフルエンザウィルス、ムンプスウィルス、モルビウィルス属に属する麻疹ウィルスやニューモウィルスに属するRSウィルスが挙げられる。これらのウィルスによる感染疾患とは、これらのウィルスに起因する普通感冒様症状、気管支炎、肺炎、麻疹様疹、耳下腺腫脹、髄膜炎、肝炎などの症状を呈する疾患と定義され、その発症病名としてはインフルエンザ、麻疹、気道感染症、呼吸器感染症、亜急性硬化性全脳炎、無菌性髄膜炎、耳下腺炎、普通感冒などが対象となる。

【0012】また本発明におけるミゾリピンの使用量としては、例えば、成人1日量として1~20mg/kg(体重)を1日1~3回分割投与、または、5~500mg/時を適宜ミゾリピンを含有するエアゾール製剤として吸入投与すればよい。例えば好ましくは体重50~60kgの患者成人に対してミゾリピン経口投与用製剤2.5mgまたは50mg錠を用いて1回300mg量のミゾリピンを1日3回分割投与するか、あるいは50mg/時/3~18時間/日エアゾール投与すればよい。

【0013】

【実施例】本発明の実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明は何等これらによって限定されるものではない。

い。

【実施例 1】

パラミクソウィルス科に属する麻疹ウィルス (Measles virus) に対する抗ウィルス活性
抗ウィルス活性は、プラーク減少法 (plaque reduction method: Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol. 36, No. 2, 435-439, 1992) に従って測定した。具体的には、Vero細胞を24穴プラスチックプレート (ファルコン3702) に牛胎児血清10%を加えたD-MEM培地を用いて37℃、5%炭酸ガス培養装置内で18時間培養し単層培養細胞が形成された後、培養液を取り除き20~100PFU (plaque forming units) の麻疹ウィルス 杉山株 (Measles Virus Sugiyama strain: Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol. 36, No. 2, 435-439, 1992) を接種した。所定の濃度の無水系結晶ミゾリンと2%牛胎児血清と0.75%メトセル (Methocel A-4M premium: ダウケミカル社製、以下メトセルと略称) を含むD-MEM培地1.0mlを添加して35℃、5%炭酸ガス培養装置内で2日間培養したのちホルマリン固定後クリスタルバイオレット染色し顕微鏡下でプラーク数を測定した。測定されたプラーク数より下記の式に従って抗ウィルス効果 (EC₅₀) を算出した。

【0014】 抗ウィルス効果 (EC₅₀) = 10^A

(式中、Aは下記の式

【数1】

$$A = \log 2 \times \frac{50\% - B}{C - B} + \log D$$

(式中、Bは阻止率50%未満の最大の阻止率を、Cは阻止率50%を超える最小の阻止率を、Dは阻止率50%未満の最大の薬液濃度を示す) で求められる値を示す) 以上の結果を表1に示す。

【0015】

【実施例 2】

パラミクソウィルス科に属する3型パラインフルエンザウィルス (Parainfluenzae type 3 C243 strain) に対する抗ウィルス活性
抗ウィルス活性は、前項と同様に測定した。具体的には、Vero細胞を24穴プラスチックプレートに牛胎児血清10%を加えたD-MEM培地を用いて37℃、5%炭酸ガス培養装置内で18時間培養し単層培養細胞が形成された後、培養液を取り除き20~100PFUの3型パラインフルエンザウィルスC243株 (Parainfluenzae type 3 C243 HA

-1 strain: Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol. 36, No. 2, 435-439, 1992) を接種した。所定の濃度のミゾリンと2%牛胎児血清と0.75%メトセルを含むD-MEM培地1.0mlを添加して35℃、5%炭酸ガス培養装置内で2日間培養したのちホルマリン固定後クリスタルバイオレット染色し顕微鏡下でプラーク数を測定した。測定されたプラーク数より実施例1と同様に抗ウィルス効果 (EC₅₀) を算出した。以上の結果を表2に示す。

【0016】

【実施例 3】

パラミクソウィルス科に属するRSウィルスに対する抗ウィルス活性
抗ウィルス活性は、前項と同様に測定した。具体的には、G-HeLa細胞を24穴プラスチックプレートに牛胎児血清10%とグルコース16g/lを加えたD-MEM培地を用いて37℃、5%炭酸ガス培養装置内で18時間培養し80%の単層培養細胞が形成された後、培養液を取り除き20~100PFUのRSウィルス 101株 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol. 36, No. 2, 435-439, 1992) を接種した。所定の濃度のミゾリンと2%牛胎児血清と0.75%メトセル及びグルコース16g/lを含むD-MEM培地1.0mlを添加して35℃、5%炭酸ガス培養装置内で4日間培養したのちホルマリン固定後クリスタルバイオレット染色し顕微鏡下でプラーク数を測定した。測定されたプラーク数より前項と同様に抗ウィルス効果 (EC₅₀) を算出した。以上の結果を表3に示す。

【0017】

【実施例 4】

オルトミクソウィルス科に属するB型インフルエンザに対する抗ウィルス活性
抗ウィルス活性は、MTT-マイクロプレート法 (MTT-Microplate method: 代謝, Vol. 28, No. 2, 眼でみるページ333, 1991) に従って測定した。具体的には、MDCK細胞を96穴プラスチックプレート (ファルコン3402) に牛胎児血清8%を加えたD-MEM培地を用いて37℃、5%炭酸ガス培養装置内で36時間培養し80%の単層培養細胞が形成された後、培養液を取り除き200×TCID₅₀ (Tissue Culture infection dose 50) のB型インフルエンザウィルスシンガポール株 (influenza virus B/Singapore strain: Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol. 36, No. 2, 435-439, 1992) を接種した。所定の濃度のミゾリンと2%牛胎児血清と0.025mg/mlトリブ

シンを含むD-MEM培地100 μ lを添加して35℃、5%炭酸ガス培養装置内で5日間培養したのち、5mg/mlのMTT溶液を10 μ l添加し4時間37℃で反応させ、5%トライトンX-100と0.04N塩酸を含むイソプロパノール100 μ l添加し室温で18～24時間放置した後、マイクロプレートリーダー（パイオラッド社製、Model-3550）で各穴の吸光度を測定し、測定された吸光度より抗ウイルス効果（EC₅₀）を算出した。以上の結果を表4に示す。

【0018】

【実施例 5】

ミゾリビン（無水系結晶） 50mg
無水乳酸 126mg
結晶セルロース 20mg
カルボキシメチルセルロース
カルシウム 10mg
ステアリン酸マグネシウム 2mg
の粗成にて混合し、乾式造粒を行い、整粒し、この造粒粉にステアリン酸マグネシウム2mgを加えて打錠して、1錠210mg（ミゾリビン50mg含有）を得、これを該ウイルスによる感染疾患の予防または治療剤と

して使用する。

【0019】

【実施例 6】

ミゾリビン 3.0g
亜硫酸ナトリウム 1.0g
リン酸水素二ナトリウム 0.5g
塩化ベンザルコニウム 0.01g
水酸化ナトリウム 適量（pH8.0）
滅菌精製水 全量 100ml
滅菌精製水約80mlに亜硫酸ナトリウム1.0g、リン酸水素二ナトリウム・12水塩0.5gおよびミゾリビン3.0gを順次加えて溶した。この液に塩化ベンザルコニウム0.01gを加えて溶かし、さらに水酸化ナトリウムを加えてpHを約8に調整し、滅菌精製水を加えて全量100mlとした。この液を濾過滅菌したのち、エアゾール吸入用容器に無菌的に充填してエアゾール吸入用製剤を得、これを該ウイルスによる感染疾患の予防または治療剤として使用する。

【0020】

【表1】

薬剤名	用量 (μ l/ml)	33.3	11.1	3.7	1.24	0.4	0 (対照)	EC ₅₀
ミゾリビン	フーケ数	0	0	8	24	48	52	0.74
	阻止率	100	100	84.7	53.8	7.6	-	
リビリン	フーケ数	10	25	45	45	50	55	6.72
	阻止率	81.9	54.5	18.2	18.2	9.1	-	

【0021】

【表2】

薬剤名	用量 (μ l/ml)	33.3	11.1	3.7	1.24	0.4	0 (対照)	EC ₅₀
ミゾリビン	フーケ数	0	1	48	89	101	100	2.81
	阻止率	100	99	52	11	0	-	
リビリン	フーケ数	0	53	98	110	95	100	26.0
	阻止率	100	47	2	0	5	-	

【0022】

【表3】

薬剤名	用量 (μ l/ml)	33.3	11.1	3.7	1.24	0.4	0 (対照)	EC ₅₀
ミソリビン	方-7数	0	0	1	19	44	79	0.44
	阻止率	100	100	98	75	44	-	

【0023】

【表4】

薬剤名	用量 (μ l/ml)	100	25	6.25	1.56	0 (対照)	EC ₅₀
ミソリビン	吸光度	0.78	0.99	0.81	0.35	0.18	3.34
	阻止率	78	99	81	35	-	

【0024】

【発明の効果】ミソリビンは、表1、2で示した通りパラミクソインフルエンザ科に属する麻疹ウィルス、3型パラインフルエンザウィルスに対してリバビリンより約10倍もの極めて強い抗ウィルス活性を示し、さらに表3、4で示す通り種々のRNAウィルスのうち、パラミクソウィルス科、オルトミクソウィルス科に属するウィルスにも強い抗ウィルス活性を有した。

【0025】これらの結果より、ミソリビンはオルトミクソウィルス科またはパラミクソウィルス科に属する特定のRNAウィルスに極めて少量で強い抗ウィルス活性を示す薬剤であり、また細胞毒性も低いことから、これらのウィルスに起因するインフルエンザ、麻疹、呼吸器感染症、亜急性硬化性全脳炎、無菌性髄膜炎、耳下腺炎、普通感冒などの感染疾患の予防または治療剤として有用である。

【手続補正書】

【提出日】平成5年6月25日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項2

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項2】 予防または治療剤が、経口投与用製剤、注射投与用製剤またはエアゾール吸入用製剤である請求項1記載の予防または治療剤。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】また、例えばエアゾール用液剤や注射投与用製剤としては、ミソリビンを水性溶媒に溶解させることによって製造することができ、ミソリビンの液剤中における濃度は水性溶媒に対して、0.1〜10W/V%、好ましくは1〜10W/V%程度になるように調整し、特に注射投与用製剤については調整後滅菌または除

菌処理して製剤とすればよい。この水性溶媒としては、例えば注射用蒸留水、滅菌精製水等が例示される。さらに通常液剤に適宜選択して用いられる添加剤、例えばpH調整用の緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酒石酸緩衝液、酢酸緩衝液等）、等張化剤（例えば、ソルビトール、グリセリン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グルコース、塩化ナトリウム等）、安定化剤（例えば、亜硫酸、亜硫酸水素塩、メタ重亜硫酸塩等）、防腐殺菌剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸エステル類、ベンジルアルコール、パラクロルメタキシノール、クロルクレゾール、フェネチルアルコール、ソルビン酸またはその塩、チメロザール、クロロブタノール等）、キレート剤（例えば、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、縮合リン酸ナトリウム等）、粘調剤（例えば、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸ナトリウム等）等を通常使用される添加量で配合添加することができる。

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claims]

[Claim 1] An agent for preventing or treating an infectious disease by a human-infectious virus belonging to a family of Orthomyxovirus or Paramyxovirus, which comprises mizoribine as an active ingredient.

[Claim 2] The agent of Claim 1, wherein the preventing or treating agent is a preparation for oral administration or a preparation for aerosol inhalation.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention, It is related with the prevention or the treating agent of an infection disease by the virus belonging to the department of an orthomyxovirus or Paramyxoviridae which makes an active principle mizoribine (Mizoribine: chemical name; 4-carbamoyl 1-beta-D-ribofuranosyl imidazolium 5-olate).

[0002]

[Description of the Prior Art] Mizoribine is the nucleic acid related compound discovered from the culture medium of M-2166 shares (FERM P-1104) of OIPENISHIRIUMU BUREFERUDIANAMU belonging to an OIPENISHIRIUMU group, Are the weak acidic material which it is easily dissolvable to water and is understood by brown firing near 200 **, and as the manufacturing method, various methods, such as the fermenting method using the above-mentioned strain and a chemosynthesis method, are known (J. -- Antibiotics, 27, and (10.)) 775 (1974), Chem.Pharm.Bull., 23,245 (1975), JP,S48-56894,A, JP,S50-121275,A, JP,S50-121276,A, JP,S51-1693,A, etc.

[0003] Mizoribine has an immunosuppressive action, for example, usefulness is observed in control of the rejection in the renal transplantation, Usually, it is considered as the Bredinin (proprietary product name: made by Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) lock which administers orally 2-3 mg of mizoribine considerable amount per weight of 1 kg, and as initial

quantity, and administers a 1-2-mg considerable amount orally as daily dose as a maintenance dose, and the non-drainage system crystalline is used. it is known that mizoribine shows the strong antiviral activity to the vaccinia virus which is a DNA virus -- **** (JP,S48-56894,A). Not taking effect is reported to the mouse infectivity 1 type parainfluenza HVJ virus which is an RNA virus, or the poliovirus (J. Antibiotics, 27, (10), 775 (1974)).

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]In recent years, the chemotherapeutic drug to a herpesvirus, an AIDS virus, etc. was developed, and the causal therapy of the viral disease became possible. the departments of an orthomyxovirus (for example, A type, B type, influenza virus type C, etc.), or Paramyxoviridae (for example, a measles virus,) a mumps virus, a parainfluenza virus, a RISUPI lei tally SHINSHICHIARU virus (Respiratory syncytialvirus; a following RS virus and abbreviation), etc. -- etc. -- various RNA viruses, It is a virus which it should be most careful of as a pathogenic virus of the variety infection disease which makes virus respiratory infection the start. Except for the influenza of the measles which presented a characteristic exanthema, mumps with typical parotid enlargement, and the fashion stadium acmes, it is difficult to judge clinically the pathogenic virus of the disease by the virus belonging to these two departments of a virus. Then, it is anxious for the antivirotic which has large spectrum with these viruses (the field of a chemotherapy, Vol.7 No.10 1991).

[0005]By the present, to the above-mentioned department of an orthomyxovirus and Paramyxoviridae, amantadine hydrochloride, there is a report that rimantadine hydrochloride and ribavirin (1-beta-D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide) are effective (J. -- Med. and 281:578-584 (1969).) 381:1443-1447 (1983), J.pedtar., 117,313-320 (1990). However, two of the former are effective only in A type influenza of the department of an orthomyxovirus, and they are invalid with the virus of B and C type influenza or Paramyxoviridae. On the other hand, although ribavirin has antiviral activity widely with the virus of these two ** and is approved as an only antivirotic to an RS virus in the U.S., cytotoxicity is strong and there are restrictions of versatility, such as requiring the prolonged administration therapy by aerosol inhalation. Then, it was anxious for the pharmaceutical preparation whose antiviral activity is still strong more safer.

[0006]

[Means for Solving the Problem]On the other hand, as above-mentioned, although mizoribine is effective in some DNA viruses, invalid (J. -- Antibiotics, 27, and (10).) to an RNA virus To a virus to which mizoribine belongs to Paramyxoviridae or a department of an orthomyxovirus of the Homo sapiens infectivity also unexpectedly, 775 (1974) showed antiviral activity stronger than ribavirin used from the former, and completely found out that cytotoxicity was also low. As a result, it became possible to provide prevention or a treating agent superior to ribavirin.

[0007]This invention is prevention or a treating agent of an infection disease by a virus belonging to a department of the Homo sapiens infectivity orthomyxovirus or

Paramyxoviridae which was completed by the above-mentioned knowledge and makes mizoribine an active principle. Mizoribine in this invention is an already marketed immunosuppressant, Acute toxicity (LD_{50}) by taking orally to a mouse of a sex >4883 mg/kg, By hypodermic, by >3042 mg/kg and intramuscular within >4883 mg/kg and a vein >2800 mg/kg, To a male rat, by >3100 mg/kg and hypodermic by taking orally >4161 mg/kg, Receive >2572 mg/kg within a vein, receive >2800 mg/kg and a femininity rat by intramuscular, and by taking orally >2847 mg/kg, In hypodermic, it is as safe as >2800 mg/kg within >3795 mg/kg and a vein at >2608 mg/kg and intramuscular, and it is as follows and toxicity over various tissue culture cells is a cytotoxic low drug very much.

[0008][Cytotoxicity]

(Experimental method) Dulbecco minimum essential MEDIUM (below Dulbecco Minimum Essential Medium:) A Vero cell and a MDCK cell (above, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. make) were cultured using a D-MEM culture medium and a culture medium which added 10% of fetal calf serum to an abbreviation. G-HeLa cell (Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol.36, No.2., 435-439,1992) was cultured using a culture medium which added 16 g/l of glucose to this culture medium further.

[0009]96 hole plastic plate (falcon 3402) -- each cell -- every [2×10^4 cell/well] -- after adding a culture medium of mizoribine content which was poured distributively and diluted to predetermined concentration, it cultivated for three days within 37 °C and a 5% CO₂ incubation device. Toxicity over a cell was investigated by the MTT method (page 333-1991 seen by a metabolic turnover, Vol.28, .No12, and an eye).

(Result)

G-HeLa-cell (Homo sapiens cervical-canal origin cell) >500microg/ml Vero -- cell (African green monkey kidney origin cell) >500microg/ml MDCK -- cell (dog kidney cell origin cell) > -- this mizoribine 500 microg/ml, It is simple to use it as oral administration preparation (proprietary product name: Bredinin lock), and it can pharmaceutical-preparation-ize with pharmaceutical preparation-ized art of a conventional method suitably as oral administration preparation, such as a capsule and a granule, suppositories, pharmaceutical preparation by aerosol inhalation, percutaneous absorption pharmaceutical preparation, or injections. As an excipient oral administration preparation specifically, for example Anhydrous lactose, crystalline cellulose, Dextran, starch, etc. as a binding material Carboxymethylcellulose sodium, As disintegrator, methyl cellulose, ethyl cellulose, etc. Carboxymethyl cellulose, Calcium carbonate, methyl cellulose, etc. can use stearic acid, magnesium stearate, talc, etc. as oral administration preparation, such as a tablet and a capsule, with nonrandom assortment and a conventional method suitably as lubricant. [0010]For example as liquids and solutions for aerosol, or injections, can manufacture by dissolving mizoribine in an aqueous solvent, and concentration in liquids and solutions of mizoribine receives an aqueous solvent -- 0.1 - 10 W/V % -- what is necessary is to prepare so that it may become about 1 to 10% preferably, to sterilize or disinfection process after adjustment especially about injections, and just to consider it as pharmaceutical preparation As this aqueous solvent, distilled water for injection, sterile purified water, etc.

are illustrated, for example. An additive agent which chooses it as liquids and solutions suitably, and is further usually used for them, for example, a buffer for pH adjustments, for example, a phosphate buffer solution, boric acid buffer solution, citrate buffer solution, and tartaric acid buffer solution. isotonicizing agents (for example, sorbitol, glycerin, and a polyethylene glycol.), such as acetic acid buffer solution Stabilizing agents, such as propylene glycol, glucose, and sodium chloride. (For example, sulfite salt, a hydrogensulfite, metabisulfite, etc.), and antiseptic bactericides, for example, a benzalkonium chloride and p-hydroxybenzoate esters. Benzyl alcohol, PARAKURORUME taxi Norian, KURORU cresol, Phenethyl alcohol, sorbic acid or its salt, a thimerosal, chlorobutanol, etc., A chelating agent (for example, disodium edetate, sodium acid citrate, and sodium condensed phosphorate etc.), Combination addition of the viscous agents (for example, a polyvinyl pyrrolidone, methyl cellulose, carboxymethylcellulose sodium, hydroxypropylcellulose, polyvinyl alcohol, sodium polyacrylate, etc.) etc. can be carried out with an addition by which normal use is carried out.

[0011] A type, B type, and influenza virus type C which belong to a virus belonging to influenzavirus, for example, influenzavirus, as a virus belonging to a department of an orthomyxovirus of the Homo sapiens infectiosity are mentioned. As a virus belonging to Homo sapiens infectiosity Paramyxoviridae, A virus belonging to Paramyxovirus, the Morvi virus group, and a NYUMO virus group is mentioned, For example, 2 belonging to Paramyxovirus, 3 type parainfluenza virus, a mumpus virus, and an RS virus belonging to a measles virus belonging to the Morvi virus group or a NYUMO virus group are mentioned. Common cold Mr. condition which originates in these viruses with an infection disease by these viruses, It is defined as a disease which presents condition, such as bronchial inflammation, lung inflammation, a measles Mr. exanthema, parotid enlargement, meninges inflammation, and encephalitis, and influenza, measles, respiratory tract infection, respiratory tract infection, subacute sclerosing panencephalitis, aseptic meningitis, parotitis, a common cold, etc. are applicable as the onset name of a disease.

[0012] As amount of the mizoribine used in this invention, it is [1 1 to 3 times divided administrations per day, or] 1 - 20 mg/kg (weight) as adult daily dose, for example 5-500mg/What is necessary is just to carry out inhalation administration of the time as aerosol preparation which contains mizoribine suitably. For example, what is necessary is to carry out the ter-die divided administrations of the mizoribine of the amount of 300 mg once using 25 mg of pharmaceutical preparation for mizoribine internal use, or a 50-mg lock to a patient adult with a weight of 50-60 kg preferably, or just to carry out 3 to 18-hour [/] day aerosolization of the o'clock in 50mg /.

[0013]

[Example] Although working example of this invention is given and being explained concretely, this invention is not limited by these at all.

[Working example 1]

The antiviral activity antiviral activity to the measles virus (Measels virus) belonging to Paramyxoviridae, It measured in accordance with the plaque decreasing method (plaque

reduction method: Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol.36, No.2., 435-439.1992). A Vero cell specifically using the D-MEM culture medium which added 10% of fetal calf serum to 24 hole plastic plate (falcon 3702) 37 °C. After cultivating within the 5% CO₂ incubation device for 18 hours and forming the monolayer culture cell, Culture medium. It removes and is 20 - 100PFU (plaque.). Measles virus of forming units The Sugiyama stock (Measles Virus Sugiyama strain; Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol.36, No.2., 435-439.1992). It inoculated, non-drainage system crystal mizoribine of predetermined concentration, 2% fetal calf serum, and 0.75% Methocel (Methocel A-4M premium; Dow Chemical Co. make.) Methocel and 1.0 ml of D-MEM culture media including an abbreviation were added below, and it cultivated for two days within 35 °C and a 5% CO₂ incubation device --- after [after formalin fixation] Crystal Violet dyeing was carried out, and the number of plaques was measured under the microscope. According to the following formula, the antiviral effect (EC₅₀) was computed from the measured number of plaques.

[0014] Antiviral effect (EC₅₀) = 10^A (the inside of a formula and A are the following formulas) [Equation 1]

$$A = \log 2 \times \frac{50\% - B}{C - B} + \log D$$

More than the value calculated by (D shows the maximum drug concentration of less than 50% of rejection for the minimum rejection in which B exceeds the greatest rejection of less than 50% of rejection among a formula, and C exceeds 50% of rejection) is shown, a result is shown in Table 1.

[0015]

[Working example 2]

The antiviral activity antiviral activity to 3 type parainfluenza virus (Parainfluenzae type3 C243 strain) belonging to Paramyxoviridae was measured like the preceding clause. A Vero cell specifically using the D-MEM culture medium which added 10% of fetal calf serum to 24 hole plastic plate 37 °C. After cultivating within the 5% CO₂ incubation device for 18 hours and forming the monolayer culture cell, Culture medium. It removes and is the 3 mold parainfluenza virus C243 share (Parainfluenzae type3 C243 HA-1 strain; Antimicrobial Agents and Chemotherapy.) of 20 - 100PFU. Vol.36, No.2., and 435-439.1992 were inoculated. 1.0 ml of D-MEM culture media containing predetermined mizoribine, 2% fetal calf serum, and 0.75% Methocel of concentration were added, and it cultivated for two days within 35 °C and a 5% CO₂ incubation device --- after [after formalin fixation] Crystal Violet dyeing was carried out, and the number of plaques was measured under the microscope. The antiviral effect (EC₅₀) as well as [number / of plaques / which was measured] working example 1 was computed. The above result is shown in Table 2.

[0016]

[Working example 3]

The antiviral activity antiviral activity to the RS virus belonging to Paramyxoviridae was

measured like the preceding clause. After specifically culturing G-HeLa cell within 37 °C and a 5% CO₂ incubation device for 18 hours using the D-MEM culture medium which added 10% of fetal calf serum, and 16 g/l of glucose to 24 hole plus CHIKUPU rate and forming 80% of monolayer culture cell, Culture medium was removed and the RS virus long stock (Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol.36, No.2., 435-439.1992) of 20 - 100PFU was inoculated. 1.0 ml of D-MEM culture media containing predetermined mizoribine, 2% fetal calf serum, 0.75% Methocel, and 16 g/l of glucose of concentration were added, and it cultivated for four days within 35 °C and a 5% CO₂ incubation device -- after [after formalin fixation] Crystal Violet dyeing was carried out, and the number of plaques was measured under the microscope. The antiviral effect (EC₅₀) as well as [number / of plaques / which was measured] the preceding clause was computed. The above result is shown in Table 3.

[0017]

[Working example 4]

The antiviral activity antiviral activity to B type influenza belonging to the department of an orthomyxovirus was measured in accordance with the MTT-microplate method (MTT-Microplate method: page 333-1991 seen by a metabolic turnover, Vol.28, No.12, and an eye). A MDCK cell specifically using the D-MEM culture medium which added 8% of fetal calf serum to 96 hole plastic plate (falcon 3402) 37 °C. After cultivating within the 5% CO₂ incubation device for 36 hours and forming 80% of monolayer culture cell, Culture medium. It removes and is 200xTCID₅₀ (Tissue.). Culture infection dose. The influenza-virus-type-B SHINGAPORU stock of 50). (influenzae virus B/Singaporestrain;Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol.36, No.2., 435-439.1992) were inoculated. Add and 100micro of D-MEM culture media l containing predetermined mizoribine, 2% cow albumin, and 0.025mg [/ml] trypsin of concentration 35 °C. After cultivating for five days within a 5% CO₂ incubation device, do 10microl addition of a 5mg/ml MTT solution, and it is made to react at 37 °C for 4 hours, After [which contains Triton X-100 and 0.04N chloride 5%] doing isopropanol 100mul addition of and allowing to stand at a room temperature for 18 to 24 hours, The absorbance of each hole was measured with the microplate reader (the Bio-Rad make, Model-3550), and the antiviral effect (EC₅₀) was computed from the measured absorbance. The above result is shown in Table 4.

[0018]

[Example 5]

Mizoribine (anhydrous crystal)	50 mg
Anhydrous lactic acid	126 mg
Crystalline cellulose	20 mg
Carboxymethylcellulose calcium	10 mg
Magnesium stearate	2 mg

These components were mixed, dry granulation was performed, particles were granulated, 2 mg of magnesium stearate was added to the granulated powder and tableting was conducted, and 210 mg (50 mg of mizoribine contained) per tablet was obtained. This

was used as an agent for preventing or treating the infectious disease by the virus.

[0019]

[Example 6]

Mizoribine	3.0 g
Sodium sulfite	1.0 g
Disodium hydrogen phosphate	0.5 g
Benzalkonium chloride	0.01 g
Sodium hydroxide	appropriate amount (pH 8.0)
Sterile purified water	total amount 100 ml

The sodium sulfite 1.0g, disodium hydrogen phosphate dodecahydrate 0.5 g, and mizoribine 3.0 g were subsequently added to about 80 ml of sterile purified water and dissolved. 0.01 g of benzalkonium chloride was added and dissolved to this mixture, pH was adjusted to about 8 by adding sodium hydroxide, and total volume was adjusted to 100 ml by adding sterile purified water. After carrying out filtration sterilization of this liquid, a container for aerosol inhalation was filled up abacterially, and a preparation for aerosol inhalation was obtained. This was used as an agent for preventing or treating the infectious disease by the virus.

[0020]

[Table 1]

Agent	Dose (μ l/ml)	33.3	11.1	3.7	1.24	0.4	0 (Control)	EC ₅₀
Mizoribine	Number of plaques	0	0	8	24	48	52	0.74
	Blocking rate	100	100	84.7	53.8	7.6	-	
Ribavirin	Number of plaques	10	25	45	45	50	55	6.72
	Blocking rate	81.9	54.5	18.2	18.2	9.1	-	

[0021]

[Table 2]

Agent	Dose (μ l/ml)	33.3	11.1	3.7	1.24	0.4	0 (Control)	EC ₅₀
Mizoribine	Number of plaques	0	1	48	89	101	100	2.81
	Blocking rate	100	99	52	11	0	-	
Ribavirin	Number of plaques	0	53	98	110	95	100	25.0
	Blocking rate	100	47	2	0	5	-	

[0022]

[Table 3]

Agent	Dose (μ l/ml)	33.3	11.1	3.7	1.24	0.4	0 (Control)	E C ₅₀
Mizoribine	Number of plaques	0	0	1	19	44	79	0.44
	Blocking rate	100	100	98	75	44	-	

[0023]

[Table 4]

Agent	Dose (μ l/ml)	100	25	6.25	1.56	0 (Control)	E C ₅₀
Mizoribine	Absorbance	0.78	0.99	0.81	0.35	0.18	3.34
	Blocking rate	78	99	81	35	-	

[0024]

[Effects of the Invention] The mizoribine demonstrated very strong antiviral activity, about ten times stronger than ribavirin, against measles virus and type 3 parainfluenza virus belonging to a family of Paramyxo influenza virus, as shown in Tables 1 and 2. It also demonstrated strong antiviral activity against viruses belonging to families of Paramyxovirus and Orthomyxovirus among various RNA viruses as shown in Tables 3 and 4.